

侵入能を有する口腔レンサ球菌はヒト動脈内皮細胞における炎症反応を誘導する

長田 恵美

鹿児島大学病院 発達系歯科センター 口腔保健科

Invasive oral streptococci induce inflammatory response in human aortic endothelial cells

Emi Nagata

Preventive Dentistry, Developmental Dentistry Center, Kagoshima University Hospital,
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8520, Japan

ABSTRACT

Oral streptococci including *Streptococcus mutans* can gain access to the bloodstream and have been associated with cardiovascular disease. However, the roles of oral streptococci in inflammation in cardiovascular disease remain unclear. We examined the invasion of human aortic endothelial cells (HAECs) by oral streptococci and the subsequent cytokine production by viable invaded HAECs. Furthermore, we evaluated the participation of Toll-like receptors (TLRs) and cytoplasmic nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors in invaded HAECs. The oral streptococci tested were capable of invading HAECs. The number of invasive bacteria increased with the length of the co-culture period. After a certain co-culture period, some organisms were cytotoxic to the HAECs. Catalase and cytochalasin D inhibited the invasion of HAECs by the organism. HAECs invaded by *S. mutans* Xc, *Streptococcus gordonii* DL1 (Challis), *Streptococcus gordonii* ATCC 10558, and *Streptococcus salivarius* ATCC 13419 produced more cytokine (s) (interleukin-6, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1) than non-invaded HAECs, and *S. mutans* Xc induced the largest amounts of cytokines. All *S. mutans* strains of various serotypes upregulated TLR2 and NOD2 mRNA levels in HAECs. *S. mutans* Xc upregulated the intracellular TLR2 and NOD2 protein levels in HAECs. Silencing of the TLR2 and NOD2 genes in HAECs invaded by *S. mutans* Xc led to a reduction in cytokine production. These results suggest that oral streptococci may participate in the pathogenesis of cardiovascular disease and cytokine production induced by invasive *S. mutans* via intracellular TLR2 and NOD2 in HAECs may be associated with inflammation in cardiovascular disease.

Key words: oral streptococci, endothelial cells, cytokine, toll-like receptor 2, nucleotide-binding oligomerization domain 2

はじめに

口腔レンサ球菌は歯肉縁上プラークの大部分を占める口腔常在菌であり、う蝕原因菌として知られる *Streptococcus mutans* はこれに属している。多くの臨床

細菌学的研究において、口腔レンサ球菌が口腔領域以外の炎症病巣から検出されることが報告されており、口腔レンサ球菌とこれらの疾患との関係が注目されている。例えば *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*

表 1 口腔レンサ球菌のヒト動脈内皮細胞への侵入能

菌 株	各共培養時間 (h) における侵入菌数 (CFU/ ウェル)		
	4	8	24
<i>S. anginosus</i> ATCC 33397	8 ± 6 ^a	274 ± 18	細胞死
<i>S. gordonii</i> ATCC 10558	2 ± 2	126 ± 26	細胞死
<i>S. gordonii</i> DL1 (Challis)	134 ± 30	細胞死	細胞死
<i>S. intermedius</i> ATCC 31412	0	30 ± 8	細胞死
<i>S. mitis</i> ATCC 6249	6 ± 2	144 ± 38	24416 ± 2754
<i>S. mutans</i> Xc	22 ± 6	2776 ± 164	12084 ± 4184
<i>S. oralis</i> ATCC 35037	8 ± 4	154 ± 18	27166 ± 4720
<i>S. parasanguinis</i> ATCC 15911	6 ± 2	194 ± 48	40916 ± 4784
<i>S. salivarius</i> ATCC 13419	1004 ± 142	8266 ± 270	細胞死
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	4 ± 4	50 ± 14	17416 ± 2362

^a 平均値 ± 標準偏差 (n = 3) (Nagata et al., 2011¹⁷⁾ より)

および *S. mutans* は感染性心内膜炎¹⁻³⁾ から、*Streptococcus anginosus* group は肝や脳膿瘍⁴⁻⁵⁾ から、*Streptococcus mitis/pneumoniae*, *S. oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus cristatus* および *S. anginosus* group は肺炎⁶⁾ 患者から検出されている。動脈硬化は心筋梗塞、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症などの日本人の死亡原因の多くを占める疾病の原因となる血管の変化であるが、動脈硬化病巣からは *S. sanguinis*, *S. mitis*, *Streptococcus salivarius* group および *S. mutans*⁷⁻¹⁰⁾ が検出されている。

我々はこれまで口腔細菌と口腔領域以外の疾病との関係を明らかにするために、動物実験においてヒト菌垢が感染性心内膜炎¹¹⁾ や膿瘍¹²⁾ の誘発能を持つことや、感染性心内膜炎を誘発する *S. mutans* の病原因子¹³⁾ ならびに *S. oralis* の菌体表層多糖の炎症誘発メカニズム¹⁴⁾ について明らかにしてきた。*S. mutans* をはじめとする口腔レンサ球菌は、歯科診療のみならず日常の口腔清掃によって生じる一時的な菌血症において、ヒトの血液中からもっとも頻繁に検出される細菌である¹⁵⁻¹⁶⁾。したがって血管の内壁や心臓弁の表面を覆う内皮細胞は、口腔レンサ球菌によって頻繁にかつ長期間、攻撃を受けている可能性がある。本稿では、口腔レンサ球菌による心血管疾患の誘発、増悪のメカニズムを解明するために、口腔レンサ球菌とヒト動脈内皮細胞を用いて行った研究について紹介する。まず10種類の口腔レンサ球菌のヒト動脈内皮細胞への侵入能とサイトカイン産生誘導能を検討し¹⁷⁾、次にもっともサイトカイン産生誘導能が高かった *S. mutans* を用いてヒト動脈内皮細胞におけるパターン認識受容体の

発現およびサイトカイン産生への関与を評価した¹⁸⁾。

I. 口腔レンサ球菌とヒト動脈内皮細胞

A. 口腔レンサ球菌の侵入能

10種類の口腔レンサ球菌を用いて、それぞれのヒト動脈内皮細胞への侵入能を調べた。まずヒト動脈内皮細胞と口腔レンサ球菌を同数ずつ (MOI=1)、37°C、5% CO₂下で4、8、24共培養し、antibiotic protection assayによって内皮細胞に侵入した口腔レンサ球菌の数 (CFU) を計測した (表1)。共培養時間4時間では、*S. salivarius* ATCC 13419 がもっとも高い侵入能を示した。次に *S. gordonii* DL1 (Challis) と *S. mutans* Xc が高い侵入能を示し、他の口腔レンサ球菌の侵入能は低かった。*Streptococcus intermedius* ATCC 31412 の侵入は、認められなかった。共培養時間が長くなるにつれて、侵入する口腔レンサ球菌の数は増加したが、*S. gordonii* DL1 (Challis) は共培養時間8時間で、*S. gordonii* ATCC 10558, *S. salivarius* ATCC 13419, および *S. intermedius* ATCC 31412は24時間で、ヒト動脈内皮細胞を殺傷した。*S. mutans* Xc, *Streptococcus parasanguinis* ATCC15911, *S. sanguinis* ATCC10556, *S. mitis* ATCC 6249, および *S. oralis* ATCC 35037は、共培養時間24時間でヒト動脈内皮細胞を殺傷することなく、高い侵入能を示した。この菌の侵入を確認するために、侵入している菌としていない菌を区別することができる二重蛍光免疫染色法を用いて、共焦点レーザー顕微鏡で観察した (図1)。図に示すように、赤色に染色された菌が内皮細胞に侵入している様子が確

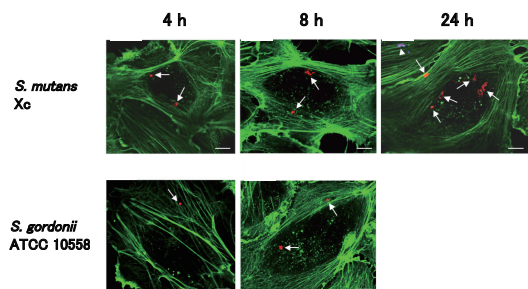


図1 ヒト動脈内皮細胞に侵入した口腔レンサ球菌
矢印, 内皮細胞に侵入した菌(赤色); 矢頭, 細胞外に存在する菌(紫色). スケールバー: 10μm(Nagata et al. 2011¹⁷より)

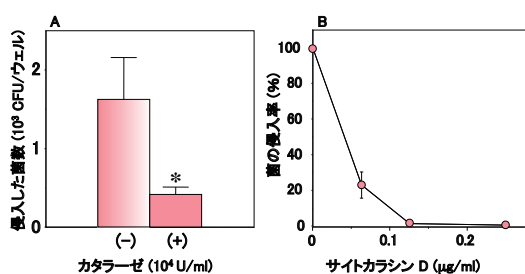


図2 カタラーゼ(A)およびサイトカラシンD(B)による菌の侵入抑制
菌の侵入率(%)=サイトカラシンD添加時の侵入した菌数/サイトカラシンD非添加時の侵入した菌数×100(%)
*P<0.05 (Bは Nagata et al. 2011¹⁷より)

認できる。次に過酸化水素を分解する子牛肝カタラーゼを培地に添加すると, *S. gordonii* DL1 (Challis) のヒト動脈内皮細胞への侵入能は低下した (図2A)。またアクチンマイクロフィラメントの重合を阻害するサイトカラシンDを培地に添加した場合も, *S. gordonii* DL1 (Challis) の侵入能は低下した (図2B)。

我々はヒト動脈内皮細胞と口腔レンサ球菌の数が同数 (MOI=1) という感染条件を用いた。これは生体内で起きていることが予想される, 少量の口腔レンサ球菌が長期間内皮細胞に作用し続けるという状況を再現したかったからである。今回用いた口腔レンサ球菌のうち, 5菌株は共培養によってヒト動脈内皮細胞を殺傷し, もっとも強い傷害作用を示したのは *S. gordonii* DL1 (Challis) であった。Stinsonら¹⁹⁾は, *S. gordonii* DL1 (Challis) が産生する過酸化水素がヒト臍帯静脈内皮細胞を殺傷することを報告している。また今回, 子牛肝カタラーゼにより *S. gordonii* DL1 (Challis) のヒト動脈内皮細胞への侵入能が低下したことより, *S.*

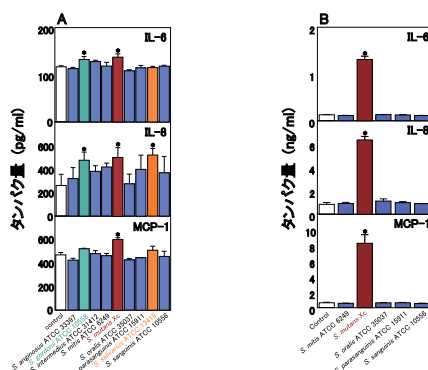


図3 口腔レンサ球菌が侵入したヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生
A, 8時間共培養後に抗生物質処理してその後24時間培養;
B, 24時間共培養後に抗生物質処理してその後24時間培養
*P<0.05 (Nagata et al. 2011¹⁷より)

gordonii の産生する過酸化水素は, 菌の内皮細胞への傷害や侵入に関与している可能性がある。さらにサイトカラシンDによって菌の侵入がほぼ完全に抑制されたことから, 菌の侵入には内皮細胞によるエンドサイトーシスが関与していることが推察される。

B. 口腔レンサ球菌のサイトカイン産生誘導能

口腔レンサ球菌がヒト動脈内皮細胞を殺傷しない, つまり口腔レンサ球菌と内皮細胞が共存している条件下でのヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生を, リアルタイムPCR法とELISA法で検討した。前記の実験(図1)で判明した内皮細胞を殺傷しない条件下で口腔レンサ球菌とヒト動脈内皮細胞を8時間あるいは24時間共培養した場合, 内皮細胞におけるIL-6, IL-8, およびMCP-1の産生誘導は認められなかった。しかしながら, 8時間あるいは24時間共培養後に, 抗生物質によって内皮細胞に侵入していない菌を死滅させ, 侵入した菌のみ生存できる状態にして内皮細胞からのサイトカインの産生を調べると, 8時間共培養後に抗生物質処理してさらに24時間培養した場合は, *S. mutans* Xc, *S. gordonii* ATCC 10558, および *S. salivarius* ATCC 13419が (図3A), 24時間共培養後に抗生物質処理してさらに24時間培養した場合は *S. mutans* Xcが (図3B), 内皮細胞からサイトカインの産生を誘導した。24時間共培養後に抗生物質処理してさらに24時間培養した場合の *S. mutans* Xc のサイトカイン産生誘導能は著しく, 内皮細胞におけるIL-6, IL-8, MCP-1のmRNA発現 (図4A) およびタンパク産生 (図4B) は経時的に

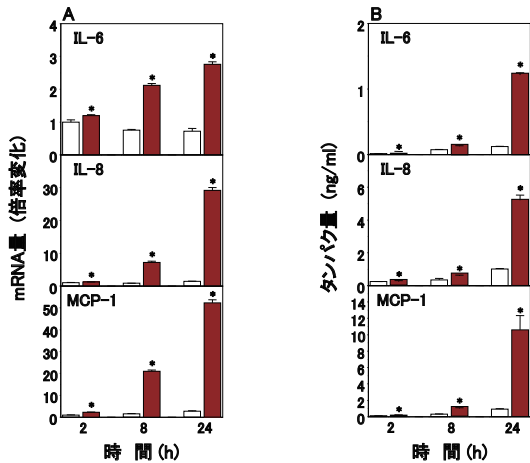


図4 *S. mutans* Xcが侵入したヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生の経時的変化
A, mRNA量の変化; B, タンパク量の変化。白, 非刺激内皮細胞; 赤, *S. mutans* Xcが侵入した内皮細胞。* $P < 0.05$ (Nagata et al. 2011¹⁷) より)

増加していた。*S. gordonii* DL1 (Challis) は, MOI=1000で1時間共培養後に抗生剤処理してさらに24時間培養した場合に, 内皮細胞からサイトカインの産生を誘導した。

IL-8と MCP-1はそれぞれ好中球および単球の遊走因子であり²⁰⁻²¹), IL-6は acute inflammatory phase proteinsを刺激して内皮細胞の機能不全を招く²²)。内皮細胞において侵入した口腔レンサ球菌によって産生誘導されたサイトカインは, 心血管疾患の発症, 増悪に関与している可能性がある。注目すべきは, これらのサイトカインが, 侵入した口腔レンサ球菌によって産生誘導された点である。サイトカインの産生を誘導する口腔レンサ球菌に関しては, 侵入細菌数が多い方が多くのサイトカインを産生誘導したことから, 内皮細胞への菌の侵入はサイトカイン産生と密接に関わっていることが推測される。また持続してサイトカインが産生され続けるためには, 菌の刺激は内皮細胞が殺傷されないレベルが保たれる必要があることは興味深い。

II. *S. mutans* とヒト動脈内皮細胞

A. *S. mutans* の侵入能とサイトカイン産生誘導能

S. mutans Xcは検討した口腔レンサ球菌の中で, ヒト動脈内皮細胞においてもっとも高い IL-6, IL-8, MCP-1産生誘導能を持つことが明らかになったが, これがXc株特有のものであるかは不明である。*S.*

表2 *S. mutans* のヒト動脈内皮細胞への侵入能

菌株 (血清型)	侵入能 (%) ^a
MT8148 (c)	0.05 ± 0.003 ^b
Xc (c)	1.3 ± 0.4
B14 (e)	5.3 ± 1.2
P4 (e)	29.2 ± 4.6
MT3940 (f)	21.2 ± 4.4

^a 侵入能 = 侵入菌数 / 内皮細胞非存在下での総菌数 × 100 (%)

^b 平均値 ± 標準偏差 (n = 3) (Nagata et al., 2017¹⁸) より)

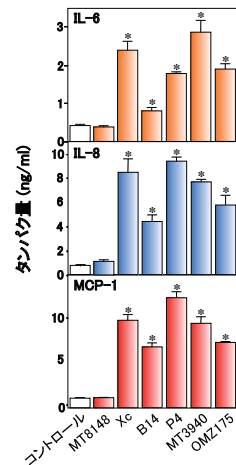


図5 *S. mutans* で刺激したヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生

* $P < 0.05$ (Nagata et al. 2017¹⁸) より)

mutans は菌体表面に有する血清型特異的多糖抗原の化学構造の違いによって, 4つの血清型 (c, e, f, k) に分類される。そこでさまざまな *S. mutans* の菌株, すなわち c 型 (MT8148, Xc), e 型 (B14, P4), および f 型 (MT3940, OMZ175) の菌株を用いて, ヒト動脈内皮細胞への侵入能およびサイトカイン産生誘導能を検討した。用いた *S. mutans* の菌株は全てヒト動脈内皮細胞に侵入したが, このうち MT8148はもっとも低い侵入能を示した (表2)。6菌株中, 5菌株はヒト動脈内皮細胞において IL-6, IL-8, および MCP-1産生を誘導したが, 侵入能が最も低かった MT8148はサイトカイン産生を誘導しなかった (図5)。

口腔内で最も高頻度に検出される *S. mutans* は c 型 (64.5-89.3%) であり, 以下 e 型 (7.0-26.1%), f 型と k 型 (それぞれ 5% 以下) と続く²³)。感染性心内膜炎患者の血液から分離される *S. mutans* の血清型の頻

度に関しては、検体数の少なさゆえにまだ一定の評価は得られていない。Vernier ら²⁴⁾ は、*S. mutans* OMZ175 (f型) の血清型特異的多糖抗原および *S. mutans* の菌体表面に存在する線毛様タンパクである antigen I/II が、ヒト臍帯静脈内皮細胞から IL-6 および IL-8 の産生を誘導することを報告していることから、*S. mutans* のヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生には、これらの菌体成分が関与している可能性がある。興味深いことに、*S. mutans* MT8148 は *S. mutans* Xc と同じ c 型であり、また antigen I/II を有するにもかかわらず、内皮細胞からサイトカイン産生を誘導しなかった。*S. mutans* MT8148 の侵入能は極めて低かったこと、および *S. mutans* Xc によるサイトカイン産生誘導は侵入した細菌数に依存したことを合わせ考えると、菌体成分のみならず、菌の内皮細胞への侵入能もサイトカイン産生誘導に関係しているかもしれない。

B. *S. mutans* を認識するヒト動脈内皮細胞のパターン認識受容体

微生物の侵襲を最初に認識するパターン認識受容体は、内皮細胞を含む宿主の多くの細胞に存在している²⁵⁾。Toll-like receptors (TLRs) と cytoplasmic nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors は、自然免疫において中心的役割を果たしているパターン認識受容体である²⁶⁾。TLR1, TLR2, TLR4²⁷⁾、および NOD2²⁸⁾ は動脈硬化病巣において発現が増加すること、また動脈硬化部位から分離した細胞において TLR2 が IL-6, IL-8, および MCP-1 産生に重要な役割を果たしていること²⁹⁾ が報告されている。そこで我々は、*S. mutans* とヒト動脈内皮細胞を共培養した時の、ヒト動脈内皮細胞における TLR1, TLR2, TLR4, NOD1, および NOD2 の mRNA の発現をリアルタイム PCR 法で検討した。非刺激のヒト動脈内皮細胞と比べて、*S. mutans* で刺激したヒト動脈内皮細胞では、TLR2 および NOD2 mRNA の発現が増加した (図 6)。このうち *S. mutans* Xc, P4, MT3940 および OMZ175 の刺激による増加量は著しく (TLR2 mRNA は 272-408 倍, NOD2 mRNA は 227-377 倍), *S. mutans* B14 による刺激では、TLR2 mRNA の発現は 108 倍, NOD2 mRNA の発現は 106 倍であった。一方、侵入能の低かった *S. mutans* MT8148 による刺激では、TLR2 mRNA の発現は 3 倍, NOD2 の発現は 5 倍であった。*S. mutans* の菌株による TLR2 ならびに NOD2 mRNA の発現の違いは、*S. mutans* 刺激によるヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生 (図 5) の傾向

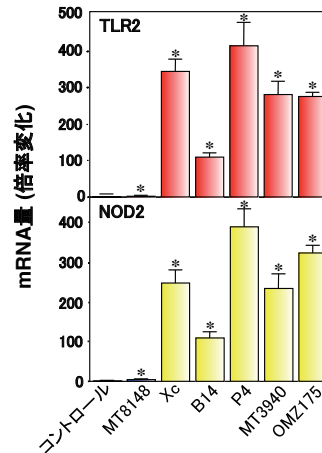


図 6 *S. mutans* Xc で刺激したヒト動脈内皮細胞におけるパターン認識受容体 mRNA 発現
*P < 0.05 (Nagata et al. 2017¹⁸⁾ より)

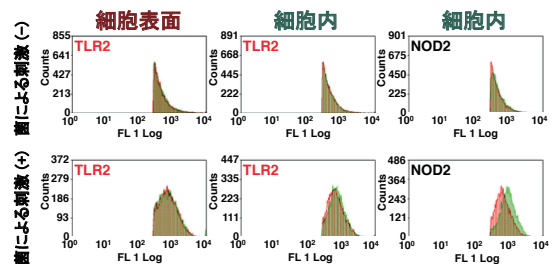


図 7 *S. mutans* Xc で刺激したヒト動脈内皮細胞におけるパターン認識受容体タンパク発現 (Nagata et al. 2017¹⁸⁾ より)

と類似していた。TLR1 mRNA の発現は、*S. mutans* P4 あるいは OMZ175 で刺激した場合に 3 倍増加した。いずれの菌株においても TLR4 および NOD1 mRNA の発現増加は認められなかった。次に *S. mutans* Xc で刺激したヒト動脈内皮細胞表面あるいは細胞内 TLR2 タンパクと細胞内 NOD2 タンパクの発現を、フローサイトメトリーで検討した。非刺激内皮細胞ではいずれの受容体もほとんど発現していなかったが、*S. mutans* Xc で刺激した内皮細胞では、細胞内の TLR2 と NOD2 タンパクの発現が有意に増加していた (図 7)。この細胞内 TLR2 タンパクは、免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡によっても確認された (図 8)。

TLR2 の内皮細胞における局在については、非刺激あるいは刺激時ともに細胞表面あるいは細胞内と 2 つの異なる局在の報告がある³⁰⁻³⁴⁾。これらの違いは、用

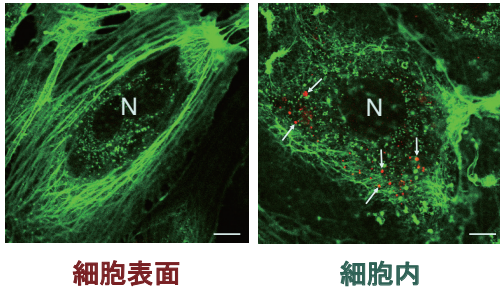


図8 *S. mutans* Xcで刺激したヒト動脈内皮細胞におけるTLR2タンパクの局在
矢印, TLR2タンパク (赤色); N, 内皮細胞の核. スケールバー: 10 μ m (Nagata et al. 2017¹⁸⁾ より)

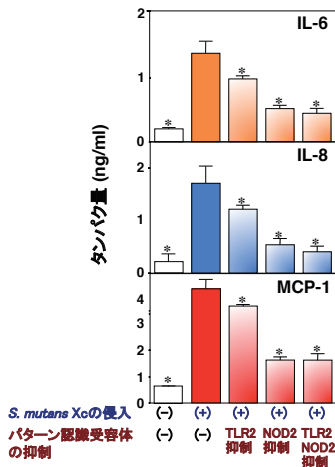


図9 侵入した *S. mutans* XcによるTLR2やNOD2の発現が抑制されたヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生誘導
* $P < 0.05$ (Nagata et al. 2017¹⁸⁾ より)

いた内皮細胞や刺激物質, 実験条件の違いによるものかもしれない。我々の研究では, 侵入能を持つ *S. mutans* の刺激により, ヒト動脈内皮細胞の細胞内においてTLR2およびNOD2の発現が増加していた。これまでに細胞表面に存在するTLR2が活性化されると, エンドサイトーシスの経路により細胞内に移行していくことが示されている³⁵⁻³⁶⁾。 *S. mutans* を認識して活性化された細胞表面のTLR2は, *S. mutans* とともにエンドサイトーシスの経路により細胞内のエンドソームに移行している可能性がある。一方, 内皮細胞におけるNOD2の細胞内局在についてはこれまでの報告と一致していた³⁷⁻⁴⁰⁾。

III. *S. mutans* によるヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生誘導へのTLR2, NOD2の関与

侵入能を持つ *S. mutans* の刺激により, ヒト動脈内皮細胞におけるIL-6, IL-8, およびMCP-1産生ならびにTLR2, NOD2の発現増加を認めたことから, *S. mutans* Xcによるヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生誘導へのTLR2, NOD2の関与を, RNA干渉によって検討した。RNA干渉によりTLR2あるいはNOD2の発現を抑制した場合, また同時に両方の発現を抑制した場合, いずれにおいても *S. mutans* 刺激時の内皮細胞におけるIL-6, IL-8, およびMCP-1産生は, TLR2やNOD2の発現が抑制されていない内皮細胞と比べて減少していた (図9)。減少率がもっとも高いのは同時にTLR2およびNOD2の発現を抑制した場合であり, 次にNOD2の発現を抑制した場合であった。以上のことから, 侵入能を持つ *S. mutans* Xcによるヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生誘導には, TLR2およびNOD2が関与していることが明らかとなった。NOD2の発現抑制によるサイトカイン産生減少率がTLR2の発現抑制の場合より大きかったことから, NOD2の関与がTLR2よりも大きい可能性がある。

今までに, 胎児肝細胞 transfectant において *S. mutans* 109c がTLR2およびNOD2を介して nuclear factor- κ B を活性化することが報告されている⁴¹⁾。また単球ではTLR2を介したサイトカイン産生において, TLR2とNOD2の相互作用が存在することが明らかとなっている⁴²⁾。今後, 侵入能を持つ *S. mutans* によるヒト動脈内皮細胞からのサイトカイン産生誘導におけるTLR2およびNOD2を介したシグナル伝達系の解明が必要と思われる。

IV. おわりに

S. mutans をはじめとする口腔レンサ球菌は, 日常の口腔清掃によって生じる一時的な菌血症において血液中からもっとも頻繁に検出される。我々は, 本研究の成果は, 全身の健康の保持, 増進のために, 日頃からの口腔衛生, 口腔疾患の予防, 治療, 管理が重要であることを社会にアピールする基礎的知見になるものと考え。今後も予防歯科医として「かかりつけ歯科医は万病に効く」ことの実績を積み上げることを目標に, 教育, 研究, 臨床に取り組んでいきたい。

謝 辞

本研究の遂行にあたりご指導くださった鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 於保孝彦教授、共に職務に励む教室の皆様、共焦点レーザー顕微鏡使用に関して親切にご指導いただいた鹿児島大学病院歯科総合診療部 中山 歩先生に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Douglas, C.W., Heath, J., Hampton, K.K., and Preston, F.E.: Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J. Med. Microbiol.*, 39, 179-182, 1993.
- 2) Fujiwara, T., Nakano, K., Kawaguchi, M., Ooshima, T., Sobue, S., Kawabata, S., Nakagawa, I., and Hamada, S.: Biochemical and genetic characterization of serologically untypable *Streptococcus mutans* strains isolated from patients with bacteremia. *Eur. J. Oral Sci.*, 109, 330-334, 2001.
- 3) Nomura, R., Nakano, K., Nemoto, H., Fujita, K., Inagaki, S., Takahashi, T., Taniguchi, K., Takeda, M., Yoshioka, H., Amano, A., and Ooshima, T.: Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. *J. Med. Microbiol.*, 55, 1135-1140, 2006.
- 4) Wagner, K.W., Schon, R., Schumacher, M., Schmelzeisen, R., and Schulze, D.: Case report: brain and liver abscesses caused by oral infection with *Streptococcus intermedius*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 102, e21-23, 2006.
- 5) Ulivieri, S., Oliveri, G., and Fillosomi, G.: Brain abscess following dental procedures. Case report. *Minerva Stomatol.*, 56, 303-305, 2007.
- 6) Bahrani-Mougeot, F.K., Paster, B.J., Coleman, S., Barbuto, S., Brennan, M.T., Noll, J., Kennedy, T., Fox, P.C., and Lockhart, P.B.: Molecular analysis of oral and respiratory bacterial species associated with ventilator-associated pneumonia. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 1588-1593, 2007.
- 7) Chiu, B.: Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am. Heart J.*, 138, S534-S536, 1999.
- 8) Lehtiniemi, J., Karhunen, P.J., Goebeler, S., Nikkari, S., and Nikkari, S.T.: Identification of different bacterial DNAs in human coronary arteries. *Eur. J. Clin. Invest.*, 35, 13-16, 2005.
- 9) Kozarov, E., Sweier, D., Shelburne, C., Progulske-Fox, A., and Lopatin, D.: Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect.*, 8, 687-693, 2006.
- 10) Nakano, K., Inaba, H., Nomura, R., Nemoto, H., Takeda, M., Yoshioka, H., Matsue, H., Takahashi, T., Taniguchi, K., Amano, A., and Ooshima, T.: Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 3313-3317, 2006.
- 11) Nagata, E., Okayama, H., Ito, H.O., Semba, I., Inoue, M., and Oho, T.: Experimental infective endocarditis induced by human supragingival dental plaque in rats. *Eur. J. Oral Sci.*, 113, 499-504, 2005.
- 12) Okayama, H., Nagata, E., Ito, H.O., Oho, T., and Inoue, M.: Experimental abscess formation caused by human dental plaque. *Microbiol. Immunol.*, 49, 399-405, 2005.
- 13) Nagata, E., Okayama, H., Ito, H.O., Yamashita, Y., Inoue, M., and Oho, T.: Serotype-specific polysaccharide of *Streptococcus mutans* contributes to infectivity in endocarditis. *Oral Microbiol. Immunol.*, 21, 420-423, 2006.
- 14) de Toledo, A., Nagata, E., Yoshida, Y., and Oho, T.: *Streptococcus oralis* coaggregation receptor polysaccharides induce inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *Mol. Oral Microbiol.*, 27, 295-307, 2012.
- 15) Roberts, G.J., Holzel, H.S., Sury, M.R., Simmons, N.A., Gardner, P., and Longhurst, P.: Dental bacteremia in children. *Pediatr. Cardiol.*, 18, 24-27, 1997.
- 16) Lockhart, P.B., Brennan, M.T., Sasser, H.C., Fox, P.C., Paster, B.J., and Bahrani-Mougeot, F.K.: Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation*, 117, 3118-3125, 2008.
- 17) Nagata, E., de Toledo, A., and Oho, T.: Invasion of human aortic endothelial cells by oral viridans group streptococci and induction of inflammatory cytokine production. *Mol. Oral Microbiol.*, 26, 78-88, 2011.
- 18) Nagata, E., and Oho, T.: Invasive *Streptococcus mutans* induces inflammatory cytokine production in human aortic endothelial cells via regulation of intracellular toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain 2. *Mol. Oral Microbiol.*, 32,

- 131-141, 2017.
- 19) Stinson, M.W., Alder, S., and Kumar, S.: Invasion and killing of human endothelial cells by viridans group streptococci. *Infect. Immun.*, 71, 2365-2372, 2003.
 - 20) Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., and Rollins, B.J.: Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell*, 2, 275-281, 1998.
 - 21) Gerard, C., and Rollins, B.J.: Chemokines and disease. *Nat. Immunol.*, 2, 108-115, 2001.
 - 22) Yudkin, J.S., Kumari, M., Humphries, S.E., and Mohamed-Ali, V.: Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*, 148, 209-214, 2000.
 - 23) Nakano, K., and Ooshima, T.: Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol.*, 4, 891-902, 2009.
 - 24) Vernier, A., Diab, M., Soell, M., Haan-Archipoff, G., Beretz, A., Wachsmann, D., and Klein, J.P.: Cytokine production by human epithelial and endothelial cells following exposure to oral viridans streptococci involves lectin interactions between bacteria and cell surface receptors. *Infect. Immun.*, 64, 3016-3022, 1996.
 - 25) Opitz, B., Eitel, J., Meixenberger, K., and Suttorp, N.: Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb. Haemost.*, 102, 1103-1109, 2009.
 - 26) Kawai, T., and Akira, S.: Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34, 637-650, 2011.
 - 27) Edfeldt, K., Swedenborg, J., Hansson, G.K., and Yan, Z.Q.: Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation*, 105, 1158-1161, 2002.
 - 28) Liu, H.Q., Zhang, X.Y., Edfeldt, K., Nijhuis, M.O., Idborg, H., Back, M., Roy, J., Hedin, U., Jakobsson, P.J., Laman, J.D., de Kleijn, D.P., Pasterkamp, G., Hansson, G.K., and Yan, Z.Q.: NOD2-mediated innate immune signaling regulates the eicosanoids in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 33, 2193-2201, 2013.
 - 29) Monaco, C., Gregan, S.M., Navin, T.J., Foxwell, B.M., Davies, A.H., and Feldmann, M.: Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis. *Circulation*, 120, 2462-2469, 2009.
 - 30) Dunzendorfer, S., Lee, H.K., Soldau, K., and Tobias, P.S.: Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *FASEB J.*, 18, 1117-1119, 2004.
 - 31) Yumoto, H., Chou, H.H., Takahashi, Y., Davey, M., Gibson, F.C., 3rd, and Genco, C.A.: Sensitization of human aortic endothelial cells to lipopolysaccharide via regulation of Toll-like receptor 4 by bacterial fimbria-dependent invasion. *Infect. Immun.*, 73, 8050-8059, 2005.
 - 32) Davey, M., Liu, X., Ukai, T., Jain, V., Gudino, C., Gibson, F.C., 3rd, Golenbock, D., Visintin, A., and Genco, C.A.: Bacterial fimbriae stimulate proinflammatory activation in the endothelium through distinct TLRs. *J. Immunol.*, 180, 2187-2195, 2008.
 - 33) Satta, N., Kruithof, E.K., Reber, G., and de Moerloose, P.: Induction of TLR2 expression by inflammatory stimuli is required for endothelial cell responses to lipopeptides. *Mol. Immunol.*, 46, 145-157, 2008.
 - 34) Shin, H.S., Xu, F., Bagchi, A., Herrup, E., Prakash, A., Valentine, C., Kulkarni, H., Wilhelmsen, K., Warren, S., and Hellman, J.: Bacterial lipoprotein TLR2 agonists broadly modulate endothelial function and coagulation pathways in vitro and in vivo. *J. Immunol.*, 186, 1119-1130, 2011.
 - 35) Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., Stevens, A., Wilson, C.B., Bassetti, M., and Aderem, A.: The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 401, 811-815, 1999.
 - 36) Brandt, K.J., Fickentscher, C., Kruithof, E.K., and de Moerloose, P.: TLR2 ligands induce NF-kappaB activation from endosomal compartments of human monocytes. *PLoS One*, 8, e80743, 2013.
 - 37) Oh, H.M., Lee, H.J., Seo, G.S., Choi, E.Y., Kweon, S.H., Chun, C.H., Han, W.C., Lee, K.M., Lee, M.S., Choi, S.C., and Jun, C.D.: Induction and localization of NOD2 protein in human endothelial cells. *Cell. Immunol.*, 237, 37-44, 2005.
 - 38) Davey, M.P., Martin, T.M., Planck, S.R., Lee, J., Zamora, D., and Rosenbaum, J.T.: Human endothelial

- cells express NOD2/CARD15 and increase IL-6 secretion in response to muramyl dipeptide. *Microvasc. Res.*, 71, 103-107, 2006.
- 39) Lv, Q., Yang, M., Liu, X., Zhou, L., Xiao, Z., Chen, X., Chen, M., Xie, X., and Hu, J.: MDP up-regulates the gene expression of type I interferons in human aortic endothelial cells. *Molecules*, 17, 3599-3608, 2012.
- 40) Wan, M., Liu, J.R., Wu, D., Chi, X.P., and Ouyang, X.Y.: E-selectin expression induced by *Porphyromonas gingivalis* in human endothelial cells via nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors and Toll-like receptors. *Mol. Oral Microbiol.*, 30, 399-410, 2015.
- 41) Segawa, T., Saeki, A., Hasebe, A., Arimoto, T., Kataoka, H., Yokoyama, A., Kawanami, M., and Shibata, K.: Differences in recognition of wild-type and lipoprotein-deficient strains of oral *Streptococci* in vitro and in vivo. *Pathog. Dis.*, 68, 65-77, 2013.
- 42) Borm, M.E., van Bodegraven, A.A., Mulder, C.J., Kraal, G., and Bouma, G.: The effect of NOD2 activation on TLR2-mediated cytokine responses is dependent on activation dose and NOD2 genotype. *Genes Immun.*, 9, 274-278, 2008.